PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C07D 493/04, 417/06, 277/24, A61K 31/425, C07F 7/08, C07D 493/08, A01N 43/78, 43/90 // (C07D 493/04, 313:00, 303:00) (C07D 493/08, 321:00, 313:00)

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/19086

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

29. Mai 1997 (29.05.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP96/05080

A1

(22) Internationales Anmeldedatum:

18. November 1996 (18.11.96) PT, SE).

Veröffentlicht

(30) Prioritätsdaten:

195 42 986.9 196 39 456.2 17. November 1995 (17.11.95) DE 25. September 1996 (25.09.96) DE Mit internationalem Recherchenbericht.

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE,

CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):
GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). KIFFE, Michael [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).

(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(54) Title: EPOTHILONE DERIVATIVES, PREPARATION AND USE

(54) Bezeichnung: EPOTHILONDERIVATE, HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract

The invention relates to epothilone derivatives and the use thereof.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilonderivate und deren Verwendung.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Osterreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungam	NZ	Neusceland
BF	Burkina Faso	IE	irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	ΙT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumanien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UΖ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN.	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

#### EPOTHILONDERIVATE, HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Epothilonderivate und deren Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Herstellung der Epothilonderivate der nachfolgend dargestellten allgemeinen Formeln 1 bis 7 sowie deren Verwendung zur Herstellung von therapeutischen Mitteln und Mitteln für den Pflanzenschutz.

4

WO 97/19086 - 4 -

In den vorstehenden Formeln 1 bis Formel 7 bedeuten:

```
R = H, C_{1-4}-Alkyl;
R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}-Alkyl,
                          C<sub>1-6</sub>-Acyl-Benzoyl,
                          C<sub>1-4</sub>-Trialkylsilyl,
                          Benzyl,
                          Phenyl,
                          C_{1-6}-Alkoxy-,
                          C6-Alkyl-, Hydroxy- und Halogen-
                          substituiertes Benzyl bzw. Phenyl;
```

wobei auch zwei der Reste R<sup>1</sup> bis R<sup>5</sup> zu der Gruppierung - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>mit n = 1 bis 6 zusammentreten können und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt;

Y und Z sind entweder gleich oder verschieden und stehen jeweils für Wasserstoff, Halogen, wie F, Cl, Br oder J, Pseudohalogen, wie -NCO, -NCS oder -N<sub>3</sub>, OH, O-( $C_{1-6}$ )-Acyl, O-( $C_{1-6}$ )-Alkyl, O-Benzoyl. Y und Z können auch das O-Atom eines Epoxides sein, wobei Epothilon A und B nicht beansprucht werden, oder eine der C-C-Bindungen einer C=C-Doppelbindung bilden.

In der Formel 3 steht X allgemein für -C(0)-, -C(S)-, -S(0)-, - $CR^{1}R^{2}$ , wobei  $R^{1}$  und  $R^{2}$  die Bedeutung haben wie oben angegeben, und -SiR2-, wobei R die Bedeutung hat wie oben angegeben.

In der Formel 4 bedeutet X Sauerstoff, NOR<sup>3</sup>, N-NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>, und N-NHCONR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>, wobei die Reste R<sup>3</sup> bis R<sup>5</sup> die oben angegebene Bedeutung haben.

In der Formel 5 bedeutet X Wasserstoff, C<sub>1-18</sub>-Alkyl, C<sub>1-18</sub>-Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl.

Für Epothilon A und B sei verwiesen auf DE-A-41 38 042. Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 1 sind ausgehend von Epothilon A und B sowie von deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Öffnung des 12,13-Epoxids zugänglich. Werden dazu Hydrogenwasserstoffsäuren in einem bevorzugt nicht wässrigen Lösungsmittel eingesetzt, wobei man die Halogenhydrine X = Hal, Y = OH und Y = OH, Y = Hal erhält. Protonensäuren wie z.B. Toluolsulfonsäure und Trifluoressigsäure führen in Gegenwart von Wasser zu 12,13-Diolen, die anschließend nach Standardverfahren acyliert (z.B. mit Carbonsäureanhydriden und Pyridin oder Triethylamin/DMAP) oder alkyliert (Alkylhalogenide und Silberoxid) werden. Die 3- und 7-Hydroxygruppen können dazu vorübergehend als Formiat (Abspaltung mit NH3/MeOH) oder p-Methoxybenzylether (Abspaltung mit DDQ) geschützt werden.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 2 sind aus Epothilon A und B sowie deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Reduktion, z.B. mit NaBH4 in Methanol erhältlich. Sind dabei 3-OH und/oder 7-OH reversibel geschützt, so können nach Acylierung oder Alkylierung und Entfernen der Schutzgruppen 5-O-monosubstituierte, 3,5- oder 5,7-O-disubstituierte Derivate der allgemeinen Formel 2 erhalten werden.

Umsetzungen von Epothilon A und B mit bifunktionellen elektrophilen Reagenzien, wie (Thio)Phosgen, (Thio)Carbonyldimidazol, Thionylchlorid oder Dialkylsilyldichloriden bzw. -bistriflaten ergeben Verbindungen der allgemeinen Formel 3. Als Hilfsbasen dienen dabei Pyridin, Trialkylamine, ggf. zusammen mit DMAP bzw. 2,6-Lutidin in einem nichtprotischen Lösungsmittel. Die 3,7-Acetale der allgemeinen Formel 3 entstehen durch Umacetalisierung z.B. von Dimethylacetalen in Gegenwart eines sauren Katalysators.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 4 werden aus Epothilon A und B oder ihren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Ozonolyse und reduktive Aufarbeitung, z.B. mit Dimethylsulfid, erhalten. Die C-16-Ketone können anschließend nach dem Fachmann geläufigen Standardverfahren in Oxime, Hydrazone oder Semicarbazone umgewandelt werden. Sie werden weiterhin durch Wittig-, Wittig-Horner-, Julia- oder Petersen-Olefinierung in C-16/C-17-Olefine überführt.

Durch Reduktion der C-16-Ketogruppe, z.B. mit einem Aluminiumoder Borhydrid, sind die 16-Hydroxyderivate gemäß der allgemeinen Formel 5 erhältlich. Diese können, wenn 3-OH und 7-OH mit entsprechenden Schutzgruppen versehen sind, selektiv acyliert oder alkyliert werden. Die Freisetzung der 3-OH- und 7-OH-Gruppen erfolgt z.B. bei O-Formyl durch NH<sub>3</sub>/MeOH, bei O-p-Methoxybenzyl durch DDQ.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel 6 werden aus Derivaten von Epothilon A und B erhalten, bei denen die 7-OH-Gruppe durch Acyl- oder Ethergruppen geschützt ist, in dem die 3-OH-Gruppe z.B. formyliert, mesyliert oder tosyliert und anschließend durch Behandlung mit einer Base z.B. DBU eliminiert wird. Die 7-OH-Gruppe kann wie oben beschrieben freigesetzt werden.

Verbindungen der allgemeinen Formel 7 werden aus Epothilon A und B oder deren 3-OH- und 7-OH-geschützten Derivaten durch basische Hydrolyse erhalten, z.B. mit NaOH in MeOH oder MeOH/Wasser. Vorzugsweise werden Verbindungen der allgemeinen Formel 7 aus Epothilon A oder B oder deren 3-OH- oder 7-OH-geschützten Derivaten durch enzymatische Hydrolyse erhalten, insbesondere mit Esterasen oder Lipasen. Die Carboxylgruppe kann mit Diazoalkanen nach Schutz der 19-OH-Gruppe durch Alkylierung in Ester umgewandelt werden.

Ferner können Verbindungen der Formel 7 durch Lactonisierung nach den Methoden von Yamaguchi (Trichlorbenzoylchlorid/DMAP), Corey (Aldrithiol/Triphenylphosphin) oder Kellogg (omega-Bromsäure/Caesiumcarbonat) in Verbindung der Formel 2 umgewandelt werden. Einschlägige Arbeitsmethoden finden sich bei

Inanaga et al. in Bull. Chem. Soc. Japan, 52 (1979) 1989; Corey & Nicolaou in J. Am. Chem. Soc., 96 (1974) 5614; und Kruizinga & Kellogg in J. Am. Chem. Soc., 103 (1981) 5183.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen kann man auch von Epothilon C oder D ausgehen, wobei zur Derivatisierung auf die vorstehend beschriebenen Derivatisierungsmethoden verwiesen werden kann. Dabei kann man die 12,13-Doppelbindung selektiv hydrieren, beispielsweise katalytisch oder mit Diimin; oder epoxidieren, beispielsweise mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure; oder in die Dihalogenide, Dipseudohalogenide oder Diazide umwandeln.

Die Erfindung betrifft ferner Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonderivate bzw. bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonderivate neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung therapeutische Mittel, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen oder einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n). Diese Mittel können insbesondere cytotoxische Aktivitäten zeigen und/oder Immunsuppression bewirken und/oder zur Bekämpfung maligner Tumore eingesetzt werden, wobei sie besonders bevorzugt als Cytostatika verwendbar sind.

WO 97/19086 PCT - 8 -

Die Erfindung wird im folgenden durch die Beschreibung von einigen ausgewählten Ausführungsbeispielen näher erläutert und beschrieben.

#### Beispiele

### Beispiel 1: Verbindung la

20 mg (0.041 mmol) Epothilon A werden in 1 ml Aceton gelöst, mit 50  $\mu$ l (0.649 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: 4 mg (19 %) Isomer I
4 mg (19 %) Isomer II

#### Isomer I

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ny = 3440 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1734 (vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256 (s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch), 884 (w), 735 (w)  $cm^{-1}$ .

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (43 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 394 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100), 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

- 9 -

<u>Hochauflösung:</u> C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>O<sub>6</sub>NS ber.: 493.2498 für [M-H<sub>2</sub>O] +

gef.: 493.2478

#### Isomer II

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.22

IR (Film): ny = 3484 (s, b, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727 (vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265 (s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w), cm<sup>-1</sup>.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (21 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 394 (12), 306 (46), 206 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100), 113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).

Hochauflösung: C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>O<sub>6</sub>NS ber.: 493.2498 für [M-H<sub>2</sub>O] +

gef.: 493.2475

### Beispiel 2: Verbindung 1b

55 mg (0.111 mmol) Epothilon A werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 N Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 90 : 10). Ausbeute: 19 mg (32 %)

PCT/EP96/05080 WO 97/19086

0.46 R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10):

3441 (s, br, Sch), 2948 (s, Sch), 1725 IR (Film): ny = (vs, Sch), 1462 (m), 1381 (w), 1265 (m), 1154 (w), 972 (m, br, Sch) cm<sup>-1</sup>.

 $\underline{UV}$  (Methanol): lambda<sub>max</sub> (lg epsilon) = 210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 529 (13 [M<sup>+</sup>]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).

529.2265 für [M<sup>+</sup>], Hochauflösung: C26H40O6ClNS ber.: gef.: 529.2280

### Beispiel 3: Verbindung lc

25 mg (0.047 mmol) 12-Chlor-13-hydroxy-epothilon A (1b) werden in 1 ml Dichlormethan gelöst, mit 29 mg (0.235 mmol) Dimethylaminopyridin, 151  $\mu$ l (1.081 mmol) Triethylamin und 20  $\mu$ l (0.517) mmol) 98 %-iger Ameisensäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wird mit Eis/Natriumchlorid abgekühlt. Nach Erreichen von -15 °C werden dem Reaktionsgemisch 40  $\mu$ l (0.423 mmol) Essigsäureanhydrid zugegeben und 70 Minuten bei -15 °C gerührt. Nachdem ein Dünnschichtchromatogramm keinen vollständigen Umsatz anzeigt, werden dem Reaktionsgemisch weitere 6 mg (0.047 mmol) Dimethylaminopyridin, 7  $\mu$ l (0.047 mmol) Triethylamin, 2  $\mu$ l 98 %-ige Ameisensäure (0.047 mmol) und 4  $\mu$ l (0.047 mmol) Essigsäureanhydrid zugesetzt und 60 Minuten gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt, mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten

organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10). Ausbeute: 5 mg (18 %)

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Aceton. 90 : 10): 0.67

IR (Film): ny = 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725 (vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch), 737 (s) cm<sup>-1</sup>

MS (20/70 eV): m/e (%) = 613 (9 [M<sup>+</sup>]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

Hochauflösung: C29H40O9NSCl ber.: 613.2112 für [M+]

gef.: 613.2131

### Beispiel 4: Verbindung 1d

10 mg (0.020 mmol) Epothilon B werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: 1 mg (9 %)

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 543 (3 [M<sup>+</sup>]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

Hochauflösung: C27H42O6NSCl ber.: 543.2421 für [M+]

gef.: 543.2405

### Beispiel 5: Verbindung 2a

100 mg (0.203 mmol) Epothilon A werden in 4 ml Tetrahydrofuran/1 M Phosphatpuffer pH 7 (1 : 1) gelöst und solange mit Natriumborhydrid (150 mg = 3.965 mmol) versetzt bis das Edukt laut Dünnschichtchromatogramm vollständig abreagiert ist. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 verdünnt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Kieselchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 95 : 5 - grad - nach Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

#### Ausbeute: (20 %)

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Aceton, 75 : 25): 0.27

IR (Film): ny = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch), 1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm<sup>-1</sup>

- 13 -

MS (20/70 eV): m/e (%) = 495 (6 [M<sup>+</sup>]), 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).

Hochauflösung: C26H41O6NS ber.: 495.2655 für [M+]

gef.: 495.2623

#### Beispiel 6:

### Verbindung 3a-d (a-d sind Stereoisomere)

100 mg (0.203 mmol) Epothilon werden in 3 ml Pyridin gelöst, mit 50  $\mu$ l (0.686 mmol) Thionylchlorid versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes und Trennung der vier Stereoisomeren 3a-d erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

#### Verbindung 3a

<u>Ausbeute:</u> 4 mg (12 %)

R<sub>f</sub> (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.50

IR (Film): ny = 2961 (m, b, Sch), 1742 (vs), 1701 (vs),

1465 (m, Sch), 1389 (m, Sch), 1238 (s,

Sch), 1210 (vs, Sch), 1011 (s, Sch), 957

(s, b, Sch), 808 (m, Sch), 768 (s, Sch)

cm<sup>-1</sup>

 $\underline{UV \text{ (Methanol)}}$ : lambda<sub>max</sub> (lg epsilon) = 210 (4.50), 248 (4.35)

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (40 [M<sup>+</sup>]), 457 (22), 362 (16), 316 (27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151 (43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

Hochauflösung: C26H37O7NS2 ber.: 539.2011 für [M+]

#### Verbindung 3b

nm.

<u>Ausbeute:</u> 14 mg (13 %)

R<sub>f</sub> (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.44

 $\underline{UV}$  (Methanol): lambda<sub>max</sub> (lg epsilon) = 211 (4.16), 250 (4.08) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (27 [M<sup>+</sup>]), 475 (17), 322 (41), 306 (67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178 (32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113 (15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42), 41 (19).

<u>Hochauflösung:</u> C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>O<sub>7</sub>NS<sub>2</sub> ber.: 539.2011 für [M<sup>+</sup>]

gef.: 539.1998

#### Verbindung 3c

Ausbeute: 4 mg (4 %)

R<sub>f</sub> (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (51 [M<sup>+</sup>]), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

<u>Hochauflösung:</u> C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>O<sub>7</sub>NS<sub>2</sub> ber.: 539.2011 für [M<sup>+</sup>]

gef.: 539.2001

#### Verbindung 3d

Ausbeute: 1 mg (1 %)

 $R_f$  (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.33

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (69 [M<sup>+</sup>]), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35)

Hochauflösung: C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>O<sub>7</sub>NS<sub>2</sub> ber.: 539.2011 für [M<sup>+</sup>]

gef.: 539.1997

## Beispiel 7:

#### Verbindung 4a

10 mg (0.020 mmol) Epothilon A werden in 2 ml Dichlormethan gelöst, auf -70 °C abgekühlt und anschließend 5 Minuten mit Ozon bis zur schwachen Blaufärbung behandelt. Das resultierende Reaktionsgemisch wird anschließend mit 0.5 ml Dimethylsulfid versetzt und auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch vom Lösungsmittel befreit und schließlich durch

PCT/EP96/05080

prāparative Schichtchromatographie (Laufmittel Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5) gereinigt.

Ausbeute: 5 mg (64 %)

 $R_f$  (Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5): 0.61

IR (Film): ny = 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch), 1734 (vs, Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267 (w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w)  $cm^{-1}$ .

<u>UV (Methanol)</u>: lambda<sub>max</sub> (lg epsilon) = 202 (3.53) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398  $(2 \text{ [M^+]})$ , 380 (4), 267 (14), 249 (17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).

<u>Hochauflösung:</u> C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub> ber.: 398.2305 für [M<sup>+</sup>] gef.: 398.2295

### Beispiel 8: Verbindung 6a

10 mg (0.018 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A werden in 1 ml Dichlormethan gelost, mit 27  $\mu$ l (0.180 mmol)

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Nach Beseitigung des Lösungsmittel wird das resultierende Rohprodukt in 1 ml Methanol gelöst, mit 200  $\mu$ l einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH3/ml Methanol) versetzt und über

Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lö-

Ausbeute: 4 mg (22 %)

sungsmittel im Vakuum entfernt.

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

<u>UV (Methanol)</u>: lambda<sub>max</sub> (lg epsilon) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 475  $(28 \text{ [M}^+])$ , 380 (21), 322 (37), 318 (40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151 (29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57 (26).

<u>Hochauflösung:</u> C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>O<sub>5</sub>NS ber.: 475.2392 für [M<sup>+</sup>] gef. 475.2384

### Beispiel 9: Verbindung 6b

50 mg (0.091 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A (werden in 1 ml Dichlorethan gelöst, mit 2 ml (0.013 mol)

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 12 Stunden bei 90 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit.

Die Reinigung des aus zwei Verbindungen bestehenden Rohproduktes erfolgt mittels präparativer Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10).

<u>Ausbeute:</u> 7 mg (15 %)

#### Substanzcode

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.62

IR (Film): ny = 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) cm<sup>-1</sup>.

<u>UV (Methanol)</u>: lambda<sub>max</sub> (lg epsilon) = 210 (4.44) nm.

<u>Hochauflösung:</u> C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>O<sub>6</sub>NS ber.: 503.2342 für [M<sup>+</sup>] gef.: 503.2303

### Beispiel 10: Verbindung 6c

5 mg (0.009 mmol) 3,7-Di-O-acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 150  $\mu$ l einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH<sub>3</sub>/ml Methanol) versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

<u>Ausbeute:</u> 3 mg (67 %)

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.55

IR (Film): ny = 2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641 (m), 1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237 (vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s), 963 (s, Sch), 737 (vs)  $cm^{-1}$ .

<u>UV (Methanol)</u>: lambda<sub>max</sub> (lg epsilon) = 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 517 (57 [M<sup>+</sup>]), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

<u>Hochauflösung:</u> C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>O<sub>6</sub>NS ber.: 517.2498 für [M<sup>+</sup>] gef.: 517 2492

### Beispiel 11: Verbindung 7a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon werden in 0.5 ml Methanol gelöst, mit 0.5 ml 1 N Natronlauge versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 85 : 15).

<u>Ausbeute:</u> 11 mg (52 %)

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Methanol, 85 : 15): 0.92

IR (Film): ny = 3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch),  $1703^{\circ}$  (vs), 1507 (m), 1460 (s, Sch), 1383 (m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br, Sch), 1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s) cm<sup>-1</sup>

<u>MS (20/70 eV):</u> m/e (%) = 423 (0.1 [M<sup>+</sup>]), 323 (4), 168 (89), 140 (100), 85 (31), 57 (67).

<u>Hochauflösung:</u> C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>O<sub>4</sub>NS ber.: 423.2443 für [M<sup>+</sup>] gef.: 423.2410

### Beispiel 12: Verbindung 7b

5 mg (0.009 mmol) 7-O-Acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 200  $\mu$ l einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH<sub>3</sub>/ml Methanol) versetzt und zwei Tage bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

<u>Ausbeute:</u> 3 mg (59 %)

R<sub>f</sub> (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.63

IR (Film): ny = 3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732 (vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246 (s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch) cm<sup>-1</sup>

 $\underline{UV \text{ (Methanol)}}$ : lambda<sub>max</sub> (lg epsilon) = 211 (3.75), 247 (3.59) nm.

- 21 -

MS (20/70 eV): m/e (%) = 567 (1 [M<sup>+</sup>]), 465 (4), 422 (7), 388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 140 (100), 97 (10), 71 (22), 43 (27).

<u>Hochauflösung:</u> C<sub>29</sub>H<sub>45</sub>O<sub>8</sub>NS ber.: 567.2866 für [M<sup>+</sup>]

gef.: 567.2849

#### Beispiel 13:

50 mg Epothilon A werden in 20  $\mu$ l Dimethylsulfoxid angelöst und mit 30 ml Phosphatpuffer (pH 7,1, 30 mM) verdünnt. Nach Zugabe von 5 mg Schweineleberesterase (Fa. Boehringer Mannheim) wird 2 Tage bei 30 °C gerührt. Man säuert mit 2 N HCl auf pH 5 an und extrahiert die Epothilonsäure 7 mit Ethylacetat. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum zur Trockne eingedampft. Ausbeute 48 mg (96 %).

#### Beispiel 14:

48 mg Epothilonsäure 7 werden in 6 ml THF abs. gelöst und unter Rühren mit 40  $\mu$ l Triethylamin und 16  $\mu$ l 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid versetzt. Nach 15 min wird vom Niederschlag abfiltriert und innerhalb von 15 min unter schnellem Rühren in eine siedende Lösung von 20 mg 4-Dimethylaminopyridin in 200 ml Toluol abs. getropft. Nach weiteren 10 min wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand zwischen Ethylacetat/Citratpuffer (pH 4) verteilt. Der Eindampfrückstand der organischen Phase ergibt nach präparativer HPLC Trennung 15 mg Epothilon A.

#### Beispiel 15:

Epothilone C und D als Ausgangsverbindungen

A. Produktionsstamm und Kulturbedingungen entsprechend dem Epothilon Basispatent.

#### B. Produktion mit DSM 6773

75 l Kultur werden wie im Basispatent beschrieben angezogen und zum Animpfen eines Produktionsfermenters mit 700 l Produktionsmedium aus 0.8 % Stärke, 0.2 % Glukose, 0.2 % Soyamehl, 0.2 % Hefeextrakt, 0.1 % CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0.1 % MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 8 mg/l Fe-EDTA, pH = 7.4 und optional 15 l Adsorberharz Amberlite XAD-16 verwendet. Die Fermentation dauert 7 - 10 Tage bei 30 C, Belüftung mit 2 m<sup>3</sup> Luft/h. Durch Regulierung der Drehzahl wird der pO<sub>2</sub> bei 30 % gehalten.

#### C. Isolierung

Das Adsorberharz wird mit einem 0.7 m<sup>2</sup>, 100 mesh Prozeßfilter von der Kultur abgetrennt und durch Waschen mit 3 Bettvolumen Wasser/Methanol 2:1 von polaren Begleitstoffen befreit. Durch Elution mit 4 Bettvolumen Methanol wird ein Rohextrakt gewonnen, der i. Vak. bis zum Auftreten der Wasserphase eingedampft wird. Diese wird dreimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. Eindampfen der organischen Phase ergibt 240 g Rohextrakt, der zwischen Methanol und Heptan verteilt wird, um lipophile Begleitstoffe abzutrennen. Aus der Methanolphase werden durch Eindampfen i. Vak. 180 g Raffinat gewonnen, das in drei Portionen über Sephadex LH-20 (Säule 20 x 100 cm, 20 ml/min Methanol) fraktioniert wird. Die Epothilone sind in der mit 240 - 300 min Retentionszeit eluierten Fraktion von insgesamt 72 g enthalten. Zur Trennung der Epothilone wird in drei Portionen an Lichrosorb RP-18 (15 µm, Säule 10 x 40 cm, Laufmittel 180 ml/min

Methanol/Wasser 65:35) chromatographiert. Nach Epothilon A und B werden mit  $R_{\text{t}}=90\text{-}95$  min Epothilon C und 100-110 min Epothilon D eluiert und nach Eindampfen i. Vak. in einer Ausbeute von jeweils 0.3 g als farblose Öle gewonnen.

### D. Physikalische Eigenschaften

Epothilon C R = HEpothilon D  $R = CH_3$ 

#### Epothilon C

 $C_{26}H_{39}NO_{5}S$  [477]

ESI-MS: (positiv Ionen): 478.5 für [M+H] +

1H und 13C siehe NMR-Tabelle

 $DC:R_f = 0.82$ 

DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

 $HPLC:R_t = 11,5 min$ 

Säule: Nucleosil 100 C-18  $7\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35

Fluß: 1ml/min

Detection: Diodenarray

#### Epothilon D

 $C_{27}H_{41}NO_{5}S$  [491]

ESI-MS: (positiv Ionen): 492,5 für [M+H] +

1H und 13C siehe NMR-Tabelle

 $DC:R_{f} = 0.82$ 

DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1

Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

 $HPLC:R_t = 15,3 min$ 

Säule: Nucleosil 100 C-18  $7\mu\text{m}$ , 125 x 4 mm

Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35

Fluß: 1ml/min

Detection: Diodenarray

Tabelle:  ${}^{1}H$ -und  ${}^{17}C$ -NMR Daten von Epothilon C und Epothilon D in [D<sub>6</sub>] DMSO bei 300 MHz

	Epothil	on C		Ej	pothilon [	)
H-Atom	δ (ppm)	C-Atom	ð (ppm)	გ (ppm)	C-Atom	გ (ppm)
		1	170.3		1	170.1
2-Ha	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0
2-Hp	2.50	3	71.2	2.38	3	70.8
3-H	3.97	4	53.1	4.10	4	53.2
3-OH	5.12	5	217.1	5.08	5	217.4
6-H	3.07	6	45.4	3.11	6	44.4
7-H	3.49	7	75.9	3.48	7	75.5
7-OH	4.46	8	35.4	4.46	8	36.3
8 - H	1.34	9	27.6	1.29	9	29.9
9-Ha	1.15	10	30.0	1.14	10	25.9
9-Hb	1.40	11	27.6	1.38	11	31.8*
10-Ha	1.15*	12	124.6	1.14*	12	138.3
10-Hb	1.35*	13	133.1	1.35+	13	120.3
11-На	1.90	14	31.1	1.75	14	31.6*
11-Hb	2.18	15	76.3	2.10	15	76.6
12-H	5.38**	16	137.3		16	137.2
13-H	5.44**	17	119.1	5.08	17	119.2
14-Ha	2.35	18	152.1	2.30	18	152.1
14-Hb	2.70	19	117.7	2.65	19	117.7
15-H	5.27	20	164.2	5.29	20	164.3
17-H	6.50	21	18.8	6.51	21	18.9
19-H	7.35	22	20.8	7.35	22	19.7
21-H <sub>2</sub>	2.65	23	22.6	2.65	23	22.5
22-H <sub>3</sub>	0.94	24	16.7	0.90	24	16.4
23-Н,	1.21	25	18.4	1.19	25	18.4
24-H,	1.06	27	14.2	1.07	26	
25-H3	0.90		<del>-</del>	0.91	27	22.9
26-H,				1.63	<u>.</u> ,	14.1
27-H,	2.10			2.11		

<sup>\*, \*\*</sup> Zuordnung vertauschbar

#### Beispiel 15:

### Epothilon A und 12,13-Bisepi-epothilon A aus Epothilon C

50 mg Epothilon A werden in 1.5 ml Aceton gelöst und mit 1.5 ml einer 0.07 molaren Lösung von Dimethyldioxiran in Aceton versetzt. Nach 6 Stunden Stehen bei Raumtemperatur wird i. Vak. eingedampft und durch präparative HPLC an Kieselgel (Laufmittel: Methyl-tert.butylether/Petrolether/Methanol 33:66:1) getrennt.

#### Ausbeute:

25 mg Epothilon A,  $R_t$  = 3,5 min (analyt. HPLC, 7  $\mu$ m, Säule 4 x 250 mm, Laufmittel s. o., Fluß 1.5 ml/min) und

20 mg 12,13-Bisepi-epothilon A,  $R_t = 3.7 \text{ min}$ , ESI-MS (pos. Ionen)

m/z = 494 [M+H]  $^+$   $^1$ H-NMR in [D<sub>4</sub>] Methanol, ausgewählte Signale: delta = 4.32 (3-H), 3.79 (7-H), 3.06 (12-H), 3.16 (13-H), 5.54 (15-H), 6.69 (17-H), 1.20 (22-H), 1.45 (23-H).

12,13-Bisepi-epothilon A R = H

#### Patentansprüche

#### 1. Epothilonderivat der Formel 1

wobei R = H,  $C_{1-4}$ -Alkyl;  $R^1$ ,  $R^2$  = H,  $C_{1-6}$ -Alkyl,  $C_{1-6}$ -Acyl, Benzoyl,  $C_{1-4}$ -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl,  $C_{1-6}$ -Alkoxy-,  $C_{6}$ -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acyl-gruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und Y und Z entweder gleich oder verschieden sind und jeweils für Wasserstoff, Halogen, Pseudohalogen, OH, O- $(C_{1-6})$ -Acyl, O- $(C_{1-6})$ -Alkyl oder O-Benzoyl stehen oder gemeinsam das O-Atom eines Epoxids oder eine der C-C-Bindungen einer C=C-Doppelbindung bilden, wobei Epothilon A und B ausgenomen sind.

### 2. Epothilonderivat der Formel 2

wobei R = H,  $C_{1-4}$ -Alkyl;  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  = H,  $C_{1-6}$ -Alkyl,  $C_{1-6}$ -Acyl, Benzoyl,  $C_{1-4}$ -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl,  $C_{1-6}$ -Alkoxy-,  $C_{6}$ -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acyl-gruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

### 3. Epothilonderivat der Formel 3

wobei R = H,  $C_{1-4}$ -Alkyl;  $R^1$ ,  $R^2$  = H,  $C_{1-6}$ -Alkyl,  $C_{1-6}$ -Acyl, Benzoyl,  $C_{1-4}$ -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl,  $C_{1-6}$ -Alkoxy-,  $C_{6}$ -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acyl-gruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X allgemein für -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-,  $-CR^1R^2$ - und  $-SiR_2$ - steht, wobei R,  $R^1$  und  $R^2$  die Bedeutung haben wie oben angegeben und  $R^1$  und  $R^2$  auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen bilden können; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

#### 4. Epothilonderivat der Formel 4

4

wobei R = H,  $C_{1-4}$ -Alkyl;  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  = H,  $C_{1-6}$ -Alkyl,  $C_{1-6}$ -Acyl, Benzoyl,  $C_{1-4}$ -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl,  $C_{1-6}$ -Alkoxy-,  $C_{6}$ -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkylbzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, X Sauerstoff,  $NOR^3$ ,  $N-NR^4R^5$ , und  $N-NHCONR^4R^5$  bedeutet, wobei die Reste  $R^3$  bis  $R^5$  die oben angegebene Bedeutung haben und  $R^4$  und  $R^5$  auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoff-atomen bilden können; und

Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

### 5. Epothilonderivat der Formel 5

wobei R = H,  $C_{1-4}$ -Alkyl;  $R^1$ ,  $R^2$  = H,  $C_{1-6}$ -Alkyl,  $C_{1-6}$ -Acyl, Benzoyl,  $C_{1-4}$ -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl,  $C_{1-6}$ -Alkoxy-,  $C_{6}$ -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acyl-gruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X Wasserstoff,  $C_{1-18}$ -Alkyl,  $C_{1-18}$ -Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl bedeutet und

Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

#### 6. Epothilonderivat der Formel 6

wobei R = H,  $C_{1-4}$ -Alkyl und R<sup>1</sup> = H,  $C_{1-6}$ -Alkyl,  $C_{1-6}$ -Acyl, Benzoyl,  $C_{1-4}$ -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl,  $C_{1-6}$ -Alkoxy-,  $C_{6}$ -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl ist; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

#### 7. Epothilonderivat der Formel 7

wobei R = H,  $C_{1-4}$ -Alkyl und  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4 = H$ ,  $C_{1-6}$ -Alkyl,  $C_{1-6}$ -Acyl, Benzoyl,  $C_{1-4}$ -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl,  $C_{1-6}$ -Alkoxy,  $C_{6}$ -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt; und Y und Z die Bedeutungen gemäß Anspruch 1 besitzen.

8. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 7 gemäß Anspruch 7, dadurch *gekennzeichnet*, daß man Epothilon A, Epothilon B, ein 3-OH-geschütztes Derivat derselben oder ein 7-OH-geschütztes Derivat derselben

- (a) enzymatisch hydrolysiert, insbesondere mit einer Esterase oder Lipase, oder
- (b) in alkalischem Medium hydrolysiert, insbesondere mit Natriumhydroxid in einem Methanol/Wasser-Gemisch, und das Epothilonderivat der Formel 7 gewinnt und isoliert.
- 9. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 2 gemäß Anspruch 2, dadurch *gekennzeichnet*, daß man ein Epothilonderivat der Formel 7 gemäß Anspruch 7 oder als Produkt des Verfahrens gemäß Anspruch 8
- (a) nach der Yamaguchi-Methode oder
- (b) nach der Corey-Methode oder
- (c) nach der Kellogg-Methode
- in das Epothilonderivat der Formel 2 umwandelt und dieses Umwandlungsprodukt isoliert.
- 10. Verfahren zur Herstellung von Epothilon A und/oder 12,13-Bisepi-epothilon A, dadurch gekennzeichnet, daß man Epothilon C epoxidiert, insbesondere mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure.
- 11. Verfahren zur Herstellung von Epothilon B und/oder 12,13-Bisepi-epothilon B, dadurch gekennzeichnet, daß man Epothilon D epoxidiert, insbesondere mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure.
- 12. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der Verbindungen gemäß einem der vorangehenden Ansprüche oder einer oder mehreren dieser Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).
- 13. Therapeutisches Mittel, insbesondere zum Einsatz als Cytostatikum, bestehend aus einer oder mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder einer oder

mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT Internation No

Inte mal Application No PCT/EP 96/05080

		1 ( ) ( ) ( )	
A. CLASS IPC 6	FICATION OF SUBJECT MATTER C07D493/04 C07D417/06 C07D27 C07D493/08 A01N43/78 A01N43 303:00),(C07D493/08,321:00,313:0		/08 90,
According	to International Patent Classification (IPC) or to both national cla	ssification and IPC	
	SEARCHED		
IPC 6	documentation searched (classification system followed by classific CO7D CO7F	cabon symbols)	
Documenta	tion searched other than minimum documentation to the extent th	at such documents are included in the fields sear	ched
Electronic c	tata base consulted during the international search (name of data i	base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUM	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	relevant passages	Relevant to claim No.
Х	WO 93 10121 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISHE FORSCHUNG MBH 1993 see claims	)) 27 May	1-13
	. ,		
Furt	her documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed in a	nnex.
*Special categories of cited documents:  A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  E' earlier document but published on or after the international filing date  L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  Date of the actual completion of the international search		"T' later document published after the interna or priority date and not in conflict with the cited to understand the principle or theor invention."  'X' document of particular relevance; the classification of cannot be considered novel or cannot be involve an inventive step when the document of particular relevance; the classification of considered to involve an invention document is combined with one or more ments, such combination being obvious to in the art.  '&' document member of the same patent fam.  Date of mailing of the international search	he application but y underlying the  med invention considered to nent is taken alone med invention the step when the other such docu- o a person skilled
	9 February 1997	1 3. 02. 97	_
Name and m	nailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (- 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (- 31-70) 340-3016	Authorized officer  Henry, J	

2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Internal Application No PCT/EP 96/05080

Patent document cited in search report	Publication date	Patent memi	family per(s)	Publication date
WO-A-9310121	27-05-93	DE-A- AU-A-	4138042	27-05-93 15-06-93

### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int onales Aktenzeichen
PCT/EP 96/05080

			·
A. KLAS! IPK 6	CO7D493/08 A01N43/78 A01N43	7/24 A61K31/425 C07F /90 //(C07D493/04,313	
Nach der I	303:00), (C07D493/08,321:00,313:00	•	
	ERCHIERTE GEBIETE	Nassurauori win der if N	
	rter Mindestprufstoff (Klassifikabonssystem und Klassifikabonssyr CO7D CO7F	nbole )	
Recherchie	rte aber nicht zum Mindestprüßtoff gehorende Veröffentlichungen,	sowert diese unter die recherchierten Gebiete	: fallen
Während d	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank	(Name der Datenbank und evtl. verwendete	Suchbegn [fe]
C. ALS W	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategone*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Ang	abe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 10121 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISHE FORSCHUNG MBH) 1993 siehe Ansprüche	) 27.Mai	1-13
Weite entne	ere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu hmen	X Siehe Anhang Patentiamilie	
'A' Veröffe aber nu	Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen: ntlichung, die den allgemeinen Stand der Technik desiniert, cht als besonders bedeutsam anzusehen ist	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem oder dem Priontätsdatum veröffentlicht Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur Erfindung zugrundeliegenden Prinzips o	worden ist und mit der zum Verständnis des der
Anmele L" Veröffer	Ookument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen dedatum veröffentlicht worden ist ndlichung, die geeignet ist, einen Priontätsanspruch zweifelhaft er- n zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer	Theorie angegeben ist  X Veröffentlichung von besonderer Bedeut kann allein aufgrund dieser Veröffentlich erfindenscher Tängkeit berühend betrach	ung; die beanspruchte Erfindung hung nicht als neu oder auf
anderer soll ode ausgefü	n im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden er die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie	"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutt kann nicht als auf erfinderischer Tängke werden, wenn die Veröffentlichung mit e	ung die beanspruchte Erfindung it beruhend betrachtet aner oder mehreren anderen
eine Be P. Veröffer	nutzung, die Austellung oder andere Maßnahmen bezieht ntlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach anspruchten Priontätsdatum veröffentlicht worden ist	Veröffentlichungen dieser Kategone in V diese Verbindung für einen Fachmann n "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben	aheliegend ist
	bschlusses der internationalen Recherche  . Februar 1997	Absendedatum des internationalen Rech	erchenberichts
vant und Pe	ostanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk	Bevollmächtigter Bediensteter	İ
	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (-31-70) 340-3016	Henry, J	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlich. "en, die zur selben Patentfamilie gehören

Inte males Aktenzeichen
PCT/EP 96/05080

Im Recherchenbericht ngeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied Patenti	(er) der amilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9310121	27-05-93	DE-A- AU-A-	4138042 2943792	27-05-93 15-06-93

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)